Hemmverhalten von Derivaten des polyvalenten Proteasen-Inhibitors aus Rinderorganen im Vergleich mit dem des nativen Inhibitors

Gundula Kremer

1972

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Eugen Werle

Hemmverhalten von Derivaten des polyvalenten Proteasen-Inhibitors aus Rinderorganen im Vergleich mit dem des nativen Inhibitors

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gundula Kremer

aus

Berlin- Zehlendorf

1970

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. H. Fritz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. E. Werle
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	4. Juli 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	2
2.1 Biochemie des polyvalenten Proteasen-Inhibitors	2
2.2 Therapeutische Anwendung des Inhibitors	5
1. bei Entzündung	6
2. bei Schock	9
3. bei Fibrinolyse und Gerinnung	10
2.3 Ähnlichkeit in der Sequenz des polyvalenten Proteasen-Inhibitors mit der des Bradykinins	12
3. Experimenteller Teil	14
3.1.1 Erklärung der verwendeten Abkürzungen von Inhibitorderivaten	15
3.1.2 Inhibitorderivate und ihr Ladungscharakter	17
3.2 Aufnahme der Hemmkurven	18
1. Trypsinhemmkurven des nativen Inhibitors und seiner Derivate	18
2. Chymotrypsinhemmkurven des nativen Inhibitors und seiner Derivate	19
3. Plasminhemmkurven des nativen Inhibitors und seiner Derivate	21
4. Kallikreinhemmkurven des nativen Inhibitors und seiner Derivate	22
3.3 Zusammenfassende Darstellung der Hemmkurven	24
3.4 Bestimmung der benötigten Zeitspanne bis zur Einstellung des Hemmgleichgewichtes ("Hemm-Endzeit")	24
1. mit Trypsin bei 90 proz. Hemmgrad	25
2. mit Trypsin bei 70 proz. Hemmgrad	26
3. mit Chymotrypsin bei 90 und 70 proz. Hemmgrad	27
4. mit Plasmin bei 90 proz. Hemmgrad	27
5. mit Plasmin bei 70 proz. Hemmgrad	28
6. mit Kallikrein bei 90 proz. Hemmgrad	29
7. mit Kallikrein bei 70 proz. Hemmgrad	30
8. Vergleich der Kallikrein - Hemm-Endzeiten	30
3.5 Zusammenfassende Darstellung der Hemm-Endzeiten	32

Seite

4. Diskussion 33

4.1 Die Meßergebnisse, eine Resultierende aus Ladungseffekt und sterischem Effekt 33

1. Hemmwirkung des nativen und Succinyl-Inhibitors auf Trypsin 33

2. Hemmwirkung des nativen, Succinyl-, A.M.Succinyl- und C.M.Succinyl-Inhibitors auf Plasmin 34

3. Chymotrypsin-Hemmung 34

4. Hemmwirkung des nativen, Succinyl- und C.M.Succinyl-Inhibitors auf Kallikrein 34

4.2 Erläuterungen zu den einzelnen Testmethoden 35

5. Zusammenfassung 37

6. Literaturverzeichnis 39

1. Einleitung

Proteasen-Inhibitoren sind Proteine, die durch Komplexbildung mit einem proteolytischen Enzym dessen Aktivität hemmen. Die für den Vorgang der Enzym-Inhibitor-Bindung im einzelnen verantwortlichen Mechanismen entziehen sich bis heute unserer Kenntnis. Man diskutiert, ob ionische, hydrophobe und eventuell auch kovalente Bindungen eine Rolle spielen.

Mit synthetischen Derivaten des klinisch bedeutungsvollen polyvalenten Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen wurden Untersuchungen angestellt, um herauszufinden, in welcher Weise definierte Substituenten auf die Enzym-Inhibitor-Bindung Einfluß haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ladungstragende, ungeladene und aromatische Substituenten verschiedener Größe an den nativen Inhibitor kovalent gebunden und der Einfluß dieser Substitution auf die Hemmkurven und Hemm-Endzeiten mit verschiedenen Enzymen getestet.

Mit diesen Experimenten sollte versucht werden, die Mechanismen zu beeinflussen, die die Enzym-Inhibitor-Bindung verursachen, um so einen Einblick in die Natur der Komplexbildung zu erhalten.

2. Theoretischer Teil

2.1 Biochemie des polyvalenten Proteasen-Inhibitors

Der native polyvalente Proteaseninhibitor aus Rinderorganen (als Trasylol ^{R} im Handel) wurde erstmals als Hemmstoff für Kallikrein in Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes nachgewiesen, 1929 KRAUT, FREY und WERLE (1). Verschiedene Arbeitskreise führten weitere Untersuchungen über Proteasen-Inhibitoren aus den genannten und anderen Rinderorganen wie Lunge und Pankreas durch. Zusammenfassend kann man heute sagen, daß alle beschriebenen polyvalenten Proteasen-Hemmkörper aus Rinderorganen, einschließlich des Pankreas-Trypsin-Inhibitors von M. KUNITZ (2), miteinander identisch sind. Das bewiesen nicht nur ihre gleichen Eigenschaften wie Säure- und Hitzestabilität, niederes MGW und basischer Charakter, sondern auch das gleichartige Hemmvermögen gegenüber Trypsin, Kallikrein, Chymotrypsin und Plasmin.

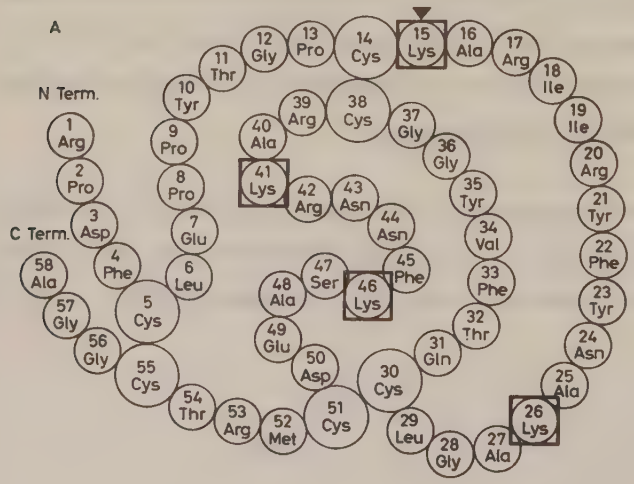


Abb. 1 Primärstruktur des polyvalenten Proteaseninhibitors

Ebenso zeigen alle Inhibitoren Stabilität gegenüber Pepsin und den genannten vier proteolytischen Enzymen, was auf eine kompakte Tertiärstruktur schließen läßt. Weitere Zweifel in Bezug auf Identität der aus verschiedenen Organen gewonnenen Inhibitoren wurden durch die Übereinstimmung der Sequenzanalysen beseitigt.

Bei dem polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen handelt es sich um ein basisches Polypeptid. Es besteht aus 58 Aminosäuren und besitzt ein MGW von 6513. In Abb. 1 ist die Primärstruktur des Inhibitormoleküls schematisch nach LASKOWSKI und ANDERER (10,11) dargestellt.

Aus der Aminosäuresequenz ist zu entnehmen, daß im Molekül 11 positiv geladenen Gruppen (6 Arg- und 4-Lys-Reste, 1 α-Aminogruppe) nur 4 bzw. 5 negativ geladene (C-terminale Carboxylatgruppe, 2 Glu- und 1 bzw. 2 Asp-Reste) gegenüberstehen. ANDERER und HÖRNLE (12) geben für den Aminosäurerest in Stellung 50 der Peptidsequenz Asn. an, KASSEL und Mitarbeiter (13) dagegen Asp. So beträgt das Verhältnis der basischen zu den sauren Resten 11:4 bzw. 11:5. Die hohe Basizität erklärt den isoelektrischen Punkt von IP 10,5.

Aus Untersuchungen von CHAUVET, ACHER u.a. (14), sowie LASKOWSKI (15) wissen wir, daß die freie ε-Aminogruppe des Lysinrestes in Stellung 15 der Peptidsequenz für die biologische Aktivität des Inhibitors von entscheidender Bedeutung ist. Bei der Umsetzung des Inhibitors mit N-Carboxyanhydrid von Alanin im Überschuß wurden alle freien Aminogruppen blockiert und man fand ein völlig inaktives Polyalanylderivat. Setzte man den Trypsin-Inhibitor-Komplex mit dem N-Carboxyanhydrid von Alanin um, so erhielt man nach Säurebehandlung zur Entfernung des ebenfalls modifizierten Trypsins ein aktives Inhibitor-Derivat. Im Molekül waren alle Aminogruppen außer der ε-Aminogruppe des Lys-15-Restes substituiert worden. Daraus schloß man, daß die ε-Aminogruppe dieses Lysinrestes im Komplex räumlich so abgeschirmt wird, daß sie auch von dem relativ kleinen N-Carboxyanhydrid-Molekül nicht substituiert werden kann (16).

Das UV-Absorptionsspektrum des Inhibitors besitzt bei 280 nm ein Maximum (pH 5,9) und bei 250 nm ein Minimum und entspricht weitgehend dem Tyrosinabsorptionsspektrum.
Die Differenzspektren geben einen gewissen Aufschluß über die pH-abhängige Veränderung der Tertiärstruktur. Im stark alkalischen Bereich erfolgt eine irreversible Veränderung der Molekülstruktur, die sich in einem veränderten Spektrum zeigt, Abb. 2, Kurve 5 (17).

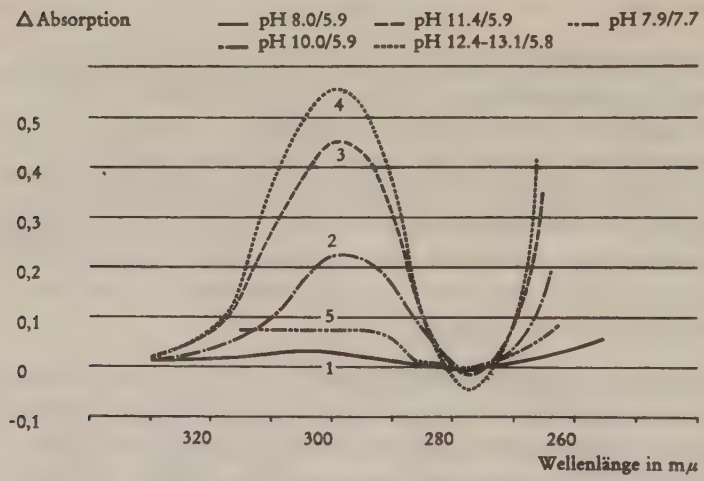


Abb. 2 Differenzspektren des nativen Inhibitors

Das Hemmspektrum des Inhibitors aus Rinderorganen erstreckt sich auf die proteolytische, esterolytische und kininliberierende Aktivität folgender Enzyme: Trypsin, Chymotrypsin, sämtlicher Kallikreine, Plasmin (Fibrinolysin) und einiger Bakterienproteinasen. Dazu kommen noch einige weniger bedeutende Proteasen.

Die reversible Reaktion mit den genannten Enzymen verläuft stöchiometrisch. Es bildet sich ein inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1:1. Die Dissoziationskonstanten dieser Komplexe sind im physiologischen pH-Bereich sehr klein und liegen beim Kallikrein-Inhibitor-Komplex bei 10^{-8} und beim Trypsin-Inhibitor-Komplex bei 10^{-12} Mol/Liter (16). Zur Einstellung des Hemmgleichgewichtes ist ferner zu bemerken, daß die Affinität des Inhibitors zum Enzym um etwa den Faktor 10^{4}-10^{8} größer ist als die des Substrates zum Enzym. Aus diesem Grunde wird beim "BAPNA"-Test, auf den später noch eingegangen wird, wesentlich mehr Substrat als Inhibitor zugesetzt.
Die Trypsin-Hemmung verläuft in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration bis zu einem 90-95%-igen Hemmgrad linear. Mit einem Inhibitorüberschuß kann das Trypsin zu 100% inaktiviert werden. Die Hemmung von Kallikrein verläuft im Bereich unter 80% ebenfalls linear. Über diesem Bereich erfolgt trotz zunehmendem Inhibitorgehalt keine proportionale Hemmwirkung und selbst mit noch größerem Inhibitorüberschuß bleibt das Kallikrein mit etwa 5% aktiv. Dies spricht für die wesentlich größere Dissoziationskonstante des Kallikrein-Inhibitor-Komplexes im Vergleich zu der des Trypsin-Komplexes. Exaktere Messungen der Dissoziationskonstanten siehe (17).

Beweisend für die stärkere Bindung des Inhibitors mit dem Trypsin ist nach TRAUTSCHOLD und Mitarbeitern (17) auch die Tatsache, daß der Zusatz von Trypsin zum KE-Inhibitor-Komplex das Kallikrein verdrängt, während der Trypsin-Komplex durch Kallikreinzugabe nicht mehr gespalten werden kann.

2.2 Therapeutische Anwendung des Inhibitors

Nach der Beschreibung der theoretischen biochemischen Faktoren des polyvalenten Proteaseninhibitors soll auch kurz auf die daraus folgenden therapeutischen Anwendungen hingewiesen werden.

Durch seine hemmende Wirkung auf proteolytische Enzyme kann man seinen Einfluß auf folgende 3 Funktionskreise (18) annehmen, die mit Sicherheit im Ablauf durch Proteasen beeinflußt werden

- Entzündung
- Schock
- Fibrinolyse und Gerinnung.

2.2.1 Die Erscheinungen der Entzündung als Reaktionsvorgang des Gefäß-Bindegewebe-Apparates auf eine körperliche Schädigung (bakteriell, thermisch usw.) sind äußerst komplex und können klinisch nach der Defination von CELSUS mit folgenden fünf Symptomen ausgedrückt werden: Rubor, Tumor, Calor, Dolor, Functio laesa. Seit einiger Zeit schreibt man den Kininen bei den Vorgängen der Entzündung und auch im Schockgeschehen (darauf wird später noch näher eingegangen) eine große Rolle zu. Ihre Hauptwirkungen sind Vasodilatation und damit Hypotension, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzerzeugung und ihre Wirkung auf die glatte Muskulatur.

Von den Kininen sind bisher drei Peptide bekannt geworden: Kinin-9 (Bradykinin), Kinin-10 (Kallidin) und Kinin-11, ein Met-Lys-Bradykinin.

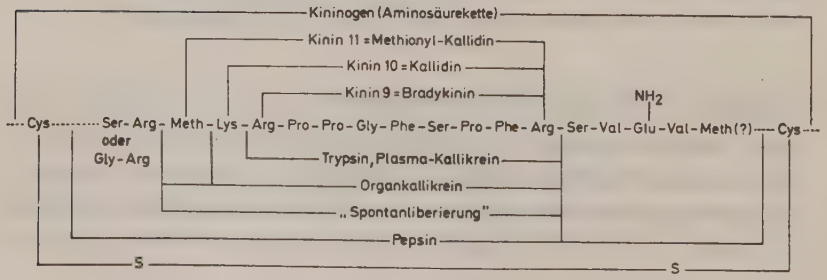


Abb. 3 Angriffspunkte einiger Enzyme am Rinderkininogen (32)

Kinine sind also kurzkettige lineare Polypeptide, die aus ihren inaktiven Vorstufen, den Kininogenen, durch proteolytische Enzyme abgespalten werden. Diese kininliberierenden Enzyme werden Kininogenasen genannt und zu ihnen gehören: Kallikrein, Trypsin, Leukozytenproteasen, Schlangengiftproteasen, einige Bakterienproteasen und Proteasen höherer Pflanzen wie Papain und Ficin.

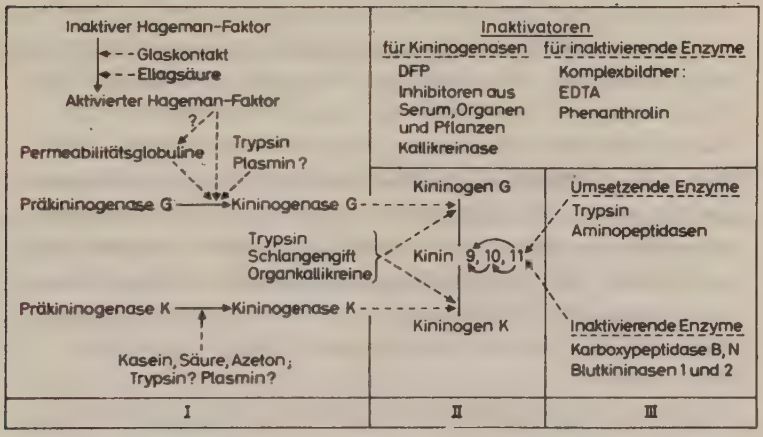


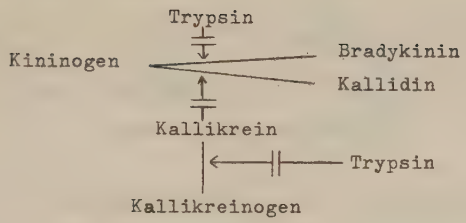
Abb. 4 Zusammenwirken der Komponenten des Kininsystems (21)

Weiterhin wird das Kininsystem durch Glaskontakt aktiviert, was zu der Annahme führte, daß der aus der Gerinnungsphysiologie bekannte HAGEMAN-Faktor bei der Aktivierung des Kininsystems beteiligt ist. Ein Versuch von WEBSTER (20) zeigte, daß aus HAGEMAN-defizientem Plasma Kallikrein zwar durch Trypsin, nicht aber durch Oberflächenkontakt freigelegt werden konnte. Daraus schloß man auf einen gemeinsamen ersten Reaktionsschritt des Gerinnungs- und Kininsystems. Heute wird zudem noch eine Aktivierung durch Permeabilitätsglobuline diskutiert (21).

Das Blutplasma enthält eine Aminopeptidase, die Kinin-11 und Kinin-10 sofort in Kinin-9 überführt. Der vollständige Abbau zu pharmakologisch unwirksamen Peptiden erfolgt dann durch die N-Carboxypeptidase.

In überaus gängigen Lehrbüchern (Lehrbuch der speziellen pathologischen Physiologie von L. HEILMEYER, Path. Anatomie von H.U. ZOLLINGER) wird wenig über die Mitbeteiligung des Kininsystems bei der Ätiologie der Entzündung und des Schocks berichtet. Dies beruht wohl darauf, daß Erkenntnisse über das Kininsystem erst neueren Datums sind. Zudem ist der Nachweis der Kininbildung bei experimentell erzeugten Entzündungen bzw. Ödemen und Schockzuständen schwer zu führen. Auf Grund ihrer kurzen Halbwertszeit von etwa 1 Kreislaufzeit (19) lassen sich die Kinine nicht quantitativ nachweisen. Somit wird bei experimentellen Versuchen der Gehalt des Plasmas an Kininogen, der inaktiven Vorstufe des Kinins, ermittelt und nicht der Gehalt an biologisch wirksamen Peptiden. Aus der Abnahme des Kininogenspiegels folgerte man eine Kininfreisetzung bei Entzündungen, Ödemen und Schockzuständen. HABERMANN (19) hat allerdings diese Schlußfolgerung in Frage gestellt. Bei seinen Experimenten entdeckte er, daß mit dem Abfall des Kininogens gleichfalls ein Abfall des Gesamtproteins verbunden ist. Außerdem stellt er einen enzymatischen Abbau des Kininogens ohne Kininfreisetzung zur Diskussion. Die Kininbeteiligung am Entzündungs- und Schockgeschehen wird dadurch jedoch nicht abgestritten, wenn auch der Senkung des Kininogenspiegels eine Kininfreilegung nicht unumstritten gleichgesetzt werden kann.

Ein therapeutisches Eingreifen in das kininbildende System wird durch den polyvalenten Proteasen-Inhibitor ermöglicht, und zwar durch seine hemmende Wirkung auf Trypsin, Kallikrein und auf die Aktivierung von Kallikreinogen zu Kallikrein durch Trypsin.



|| = Hemmung durch den nativen Inhibitor

Abb. 5 Hemmung der Kininfreisetzung durch den nativen Inhibitor

Eine Indikation zur Anwendung des Inhibitors wird immer dann vorliegen, wenn es bei einem pathologischen Geschehen zu einer Aktivierung des Kininsystems kommt, wie z.B. bei einer akuten Pankreatitis, bei einer Peritonitis, beim Endotoxin- und Verbrennungsschock usw.

2.2.2 Um die Therapie des Schocks zu verstehen, ist es notwendig, den Pathomechanismus des Geschehens vor Augen zu haben. Unter Schock versteht man allgemein den Zustand einer akuten Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens mit nachfolgender Hypotension. Daraus resultiert eine Verminderung der Gewebsdurchblutung mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Hypoxydose.

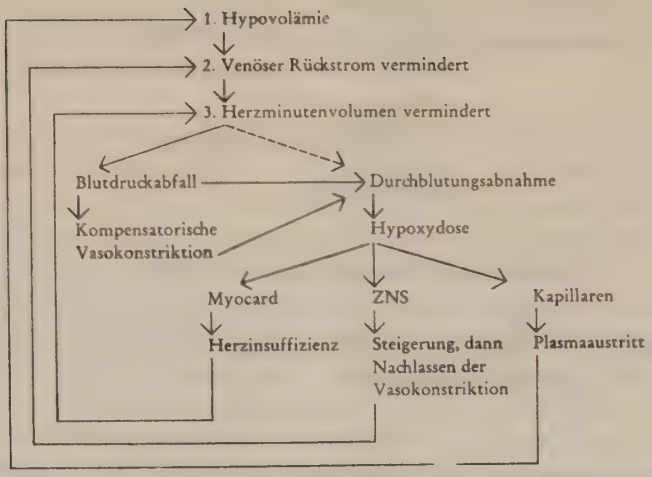


Abb. 6 Schematische Darstellung der Schockfolgen und Schockursachen.
Etwas modifiziert nach BUCHBORN (Aus "Schock und Plasmaexpander" von K.HORATZ und R.FREY, Springer-Verlag,Berlin,Göttingen,Heidelberg 1964)

Aus der schematischen Darstellung wird die Wirkung der gefäßaktiven Kinine verdeutlicht, die durch Vasodilatation eine Hypotension und durch Permeabilitätssteigerung mit Ödembildung eine Hypovolämie unterstützen. Durch therapeutische Gaben des polyvalenten Inhibitors kann der circulus vitiosus unterbrochen und damit das Schockgeschehen im weiteren Verlauf beeinflußt werden.

2.2.3 Die pharmakologische Wirkung des polyvalenten Proteasen-Inhibitors erstreckt sich nicht nur auf die Funktionskreise der Entzündung und des Schocks, sondern auch auf das Fibrinolyse-und Gerinnungssystem. Der Inhibitor besitzt eine antifibrinolytische und eine wesentlich schwächer ausgeprägte antithrombo-

plastische Wirksamkeit. Er inhibiert den Aktivator des Plasminogens und ist durch seine gleichzeitige Hemmung auf Plasmin anderen Antifibrinolytika wie α-Aminocapronsäure oder Tranexamsäure weit überlegen.

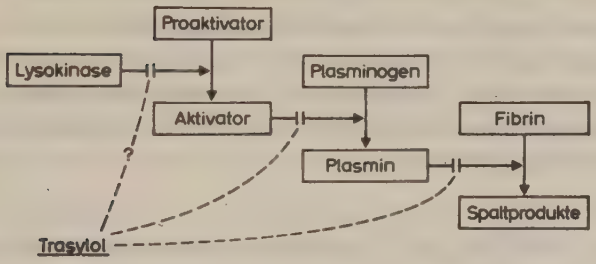


Abb. 7 Aktivierung des fibrinolytischen Systems (18)

Es ist bekannt, daß hyperfibrinolytische Krisen, d.h. starke allgemeine Blutungsneigungen, besonders bei Operationen an Uterus, Prostata, Nebenniere und Lunge vorkommen können, was durch den reichen Gehalt dieser Organe an fibrinolytischen Gewebsaktivatoren zu erklären ist (22). Chirurgische Maßnahmen der örtlichen Blutstillung führen bei diesen Blutungen kaum zum Erfolg. So hat der Inhibitor in der Gynäkologie und Geburtshilfe eine breite und erfolgreiche Anwendung gefunden. Auch bei Verbrauchskoagulopathien kommt es zu Blutungen, z.B. bei ausgeprägtem Stress und Schock. Hierbei verursachen Störungen der Mikrozirkulation eine Strömungsverlangsamung und damit eine intravasale Gerinnung. Dies führt zu einem Fibrinausfall und zu einem Verbrauch an Thrombozyten und anderen Gerinnungsfaktoren.

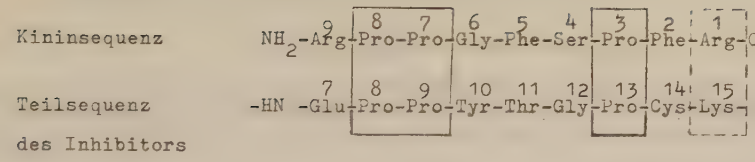
Mit jeder Aktivierung der Fibrinolyse ist eine reaktive Steigerung der Blutgerinnung gekoppelt, auf die der Inhibitor durch seine antithromboplastische Wirkung ebenfalls Einfluß nehmen kann. Dabei wirkt der Inhibitor auf die Vorphase der Gerinnung, während die Endphase, die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin, unbeeinflußt bleibt. HABERLAND fand einen Inaktivierungsprozeß in der Gerinnungskaskade bei Faktor V und verstärkt bei Faktor VIII und IX (23). Hierzu ist allerdings zu bemerken, daß die Wirkung des Inhibitors als Gerinnungshemmer unter normalen Dosierungen klinisch wenig zum Ausdruck kommt. Es sind dreimal höhere Inhibitorkonzentrationen im Vergleich zur antifibrinolytischen Wirkung erforderlich (23).

2.3 Vergleich der Sequenz des polyvalenten Proteasen-Inhibitors mit der des Bradykinins

Auf den Gedanken, die Sequenz des polyvalenten Proteasen-Inhibitors mit der Sequenz der Kinine zu vergleichen, kamen H. KREMER und G. KREMER. Es stellte sich eine erstaunliche Ähnlichkeit der Kininsequenz mit einer Teilsequenz des Inhibitors heraus. Zu diesem Vergleich führten sie folgende Überlegungen:

Sowohl der native Inhibitor als auch das Kininogen sind "Substrat" für das Trypsin in dem Sinn, daß sie sich an das aktive Zentrum des Trypsins anlagern, auch wenn der Inhibitor nicht gespalten wird und die Affinität des Inhibitors zum Enzym um ganze Größenordnungen anders liegt als beim Kininogen.

Trypsin spaltet carboxyl-ständig von Arginin und Lysin. Es spaltet die Arg-Ser-Bindung im Kininogenmolekül und würde die Bindung Lys^{15}-Ala^{16} im Inhibitormolekül spalten, wenn diese Spaltung nicht aus bisher ungeklärter Ursache verhindert würde. Das Arg^{1} des Kinins und das Lys^{15} des Inhibitors greifen beide am aktiven Zentrum des Trypsins an und sind daher mit ihren benachbarten Aminosäuren vergleichbar.



Der Vergleich zeigt eine auffallende Ähnlichkeit. Dreimal findet sich eine Übereinstimmung in der Sequenz. Jedesmal handelt es sich um Prolin. Diese Aminosäure spielt für die Tertiärstruktur von Proteinen eine wichtige Rolle. Da das Prolin keine α-Amino-Gruppe besitzt, stört es das Grundskelett der Peptidkette und führt zu einem Knick in der Helix. Diese Eigenschaft wurde bei der Aufklärung der Tertiarstruktur des Myoglobins gefunden (31).

Es fällt aber nicht nur eine Übereinstimmung beim Prolin auf. Dem Arg^{1} des Kinins entspricht das Lys^{15} des Inhibitors - beides basische Aminosäuren. Dem Tyr^{10}-Thr^{11}-Gly^{12} des Inhibitors entspricht das Gly^{6}-Phe^{5}-Ser^{4} des Kinins. In diesem Sequenzabschnitt findet man je eine aromatische Aminosäure Tyr^{10} bzw. Phe^{5}, je eine alkoholische Aminosäure Thr^{11} bzw. Ser^{4} und je eine aliphatische Aminosäure Gly^{6} bzw. Gly^{12}. So weist auch diese Dreiersequenz ein erhebliches Maß an Ähnlichkeit auf. Keine Ähnlichkeit zeigt das mit dem Cys^{14} des Inhibitors korrespondierende Phe^{2} des Kinins. Da das Cys eine Disulfidbrücke bildet, handelt es sich bei diesem Paar zumindest um voluminöse Aminosäuren. Dem Aminosäurepaar Arg^{9} und Glu^{7} ist keine Ähnlichkeit zuzusprechen. Allerdings liegen diese Aminosäuren vor dem großen Knick, der durch die beiden Prolin-Aminosäuren induziert wird.

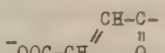
Insgesamt muß man eine erhebliche Ähnlichkeit der vergleichbaren Sequenzen feststellen, die weit über den Rahmen des Zufalls hinausgeht. Auf Grund dieser Substrat-Analogie kann man schließen, daß hinter dem Arg^{1}-Rest des Kinins die Spaltung stattfindet. Der Schluß ist deshalb zulässig, da der native Inhibitor als der einzige Hemmstoff für Organkallikrein bekannt ist. Die Komplexbildung von Kallikrein mit dem Inhibitor erfolgt am aktiven Zentrum Lys^{15}, was in der Kininsequenz dem Arg^{1}-Rest entspricht.

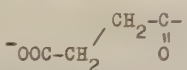
3. Experimenteller Teil

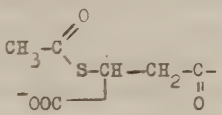
3.1.1. Erklärung der verwendeten Abkürzungen von Inhibitorderivaten

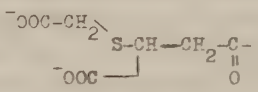
I N H. = nativer Inhibitor aus Rinderorganen

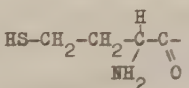
I N H.-D E R I V A T E, bei denen die α-NH_2-Gruppe des N-terminalen Argininrestes und die ε-Aminogruppen der Lysin-Reste in Stellung 26, 41 und 46 durch die angegebenen Reste substituiert (acyliert) sind:

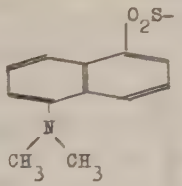
M A L E O Y L - 

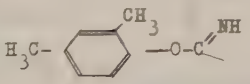
S U C C I N Y L - 

A.M.-S U C C I N Y L - (Acetylmercapto-succinyl-) 

C.M.-S U C C I N Y L - (Carboxymethyl-mercapto-succinyl-) 

H O M O C Y S T E I N - 

D A N S Y L - (1-Dimethyl-amino-naphtalin-5-sulfonyl-) 

D. M. P. T. (2,4-Dimethylphenyloxy-imino-methyl-trasylol) 

I N H.-D E R I V A T E, bei denen zusätzlich zur Substitution der genannten Aminogruppen die ε-Aminogruppe des Lysin-Restes in Stellung 15 modifiziert ist. Dies entspricht einem "Austausch" des Lysin-15-Restes durch einen:

Homoarginin-Rest^{+} G.M A L E O Y L-I N H. = N^{15}-guanidinierter Maleoyl-Inh.

Homocitrullin-Rest^{++} Ca^{15}-M A L E O Y L-I N H. = N^{15}-carbamoylierter Maleoyl-Inhibitor

---

+ besitzt eine CH_2-Gruppe mehr als der Arginin-Rest

++ Substituent:

Tabelle 1 Inhibitor-Derivate und ihr Ladungscharakter

Inhibitor	positive Gruppen	negative Gruppen
Nativer Inhibitor	11	4 (5)+
Maleoyl-Inhibitor	7	8 (9)
Succinyl-Inhibitor	7	8 (9)
A.M.Succinyl-Inhibitor	7	8 (9)
C.M.Succinyl-Inhibitor	7	12 (13)
Dansyl-Inhibitor	11	4 (5)
D.M.P.T.-Inhibitor	11	4 (5)
G. Maleoyl-Inhibitor	7	4 (5)
Ca^{15}-Maleoyl-Inhibitor	7	4 (5)
Homocystein-Inhibitor	11	4 (5)

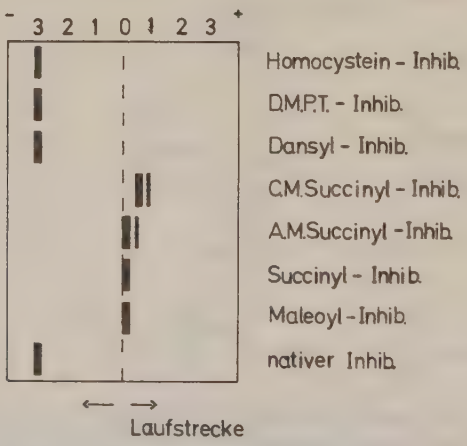


Abb. 8 Elektrophorese (schematisch)

+) ANDERER und HÖRNLE geben für den Aminosäurerest in Stellung 50 der Peptidsequenz Asn an, KASSEL u. Mitarbeiter dagegen Asp.

3.1.2 Zusammenstellung der Inhibitorderivate

Die Synthesen der Inhibitor-Derivate wurden von H.SCHULT und H. KREMER durchgeführt und in ihren Arbeiten beschrieben (30,24). Die lyophilisierten Endprodukte dienten als Ausgangspräparate für die folgenden Untersuchungen.

In Tabelle 1 sind die verwendeten Inhibitor-Derivate und ihr Ladungscharakter dargestellt. Bei einem Vergleich mit dem Elektrophorese-Schema in Abb. 8 (30) kann man die Übereinstimmung der Gesamtladung der Inhibitorderivate mit der Wanderungsrichtung und der Wanderungsstrecke im elektrischen Feld erkennen. Der native Inhibitor, Dansyl-Inhibitor, D.M.P.T.-Inhibitor und Homocystein-Inhibitor wandern mit etwa derselben Geschwindigkeit zur Kathode, da in all diesen Molekülen auf 11 positive nur 4 oder 5 negativ geladene Gruppen kommen. Der Maleoyl-, Succinyl- und A.M.Succinyl-Inhibitor verhalten sich auf Grund der nur 7 positiven, aber 8 negativen Gruppen nahezu neutral und bei der Elektrophorese findet man so gut wie keine Wanderung. Anders verhält es sich beim C.M.Succinyl-Inhibitor. Durch die Carboxymethyl-mercapto-succinyl-Gruppen ergibt sich ein Verhältnis positiver zu negativer Gruppen wie 7:12 und es erfolgt eine geringe Wanderung zur Anode. Die Auftrennung des A.M.Succinyl- und C.M.Succinyl-Inhibitors in zwei Komponenten ist erklärbar durch eine nicht vollständige Umsetzung aller Aminogruppen, so daß einige Moleküle nur mit 2 oder 3 Substituenten versehen sind.

Das Hemmverhalten der genannten Inhibitor-Derivate gegenüber den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein wird im Folgenden beschrieben. Von Interesse ist ihr Verhalten zu den genannten Enzymen vor allem im Vergleich zum nativen Inhibitor.

3.2. Aufnahme der Hemmkurven

3.2.1 Bestimmung der Trypsinhemmung durch den nativen Inhibitor und durch Inhibitor-Derivate

Bedingungen: 0,2 ml Trypsinlösung (10 mU, d.s. ca. 10 µg Trypsin) wurden mit der Inhibitorlösung (0-15 ImU) plus 0,2 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, ad 2,0 ml für 5 Min. bei 25°C inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Substratlösung (1,0 mg N^{α}-Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anlid in dest. Wasser- "BAPNA") gestartet. Die Freisetzung von p-Nitroanilin aus dem Substrat "BAPNA" ergibt eine Änderung der Extinktion, die 5 min lang alle 60 s photometrisch gemessen wurde. Zur Berechnung (25, 26). (1 mU entspricht einer Extinktionsänderung von 0,00332/min 3 ml bei 405 nm)

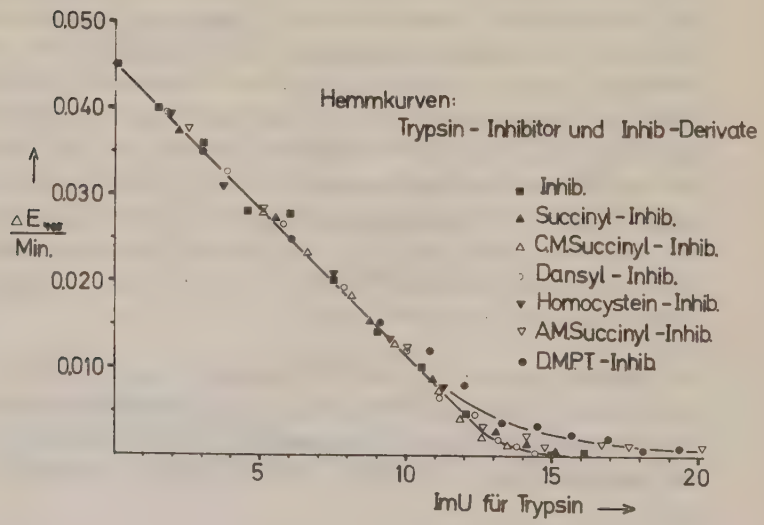


Abb. 9 Trypsin-Hemmkurven

Hemmverhalten: Die Trypsin-Hemmkurven des Succinyl-, C.M.-Succinyl-, Dansyl-, Homocystein- und A.M. Succinyl-Inhibitors entsprechen der des nativen Inhibitors. Eine Ausnahme macht der D.M.P.T.-Inhibitor, dessen Hemmkurve bei hohen Hemmgraden flacher verläuft. Er besitzt also eine größere Dissoziationskonstante und zeigt bei hohen Hemmgraden ein gering vermindertes Hemmvermögen gegenüber Trypsin im Vergleich zu den anderen Inhibitoren. Bei genügendem Inhibitor-Überschuß wird immer vollständige Hemmung des Trypsins erzielt. Beträgt der Leerwert 10 mU Trypsin (ΔE = 0,0332/min, 3 ml) so findet sich eine 50%ige Hemmung konstant für den nativen Inhibitor, sowie für alle Derivate, bei 5 ImU. Dies gilt ebenso für den sich gering anders verhaltenden D.M.P.T.-Inhibitor.

3.2.2 Bestimmung der Chymotrypsinhemmung durch den nativen Inhibitor und durch Inhibitor-Derivate

Bedingungen: 0,2 ml Chymotrypsinlösung (d.s. 20 γ Chymotrypsin "Worthington") wurden mit der Inhibitorlösung (0-100 ImU für Trypsin) plus 0,2 M Triäthanolaminpuffer (plus 0,05 M $CaCl_2$), pH 7,8, ad 2,/ ml für 5 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Substratlösung (5 mg N-[3-Carboxy-propionyl]-L-phenylalanin-p-nitroanilid in demselben Puffer gelöst) gestartet. Die Extinktionsänderung bei 405 nm wurde nach 15 s und nach weiteren 30 min gemessen. Die Extinktionsänderung erfolgt durch eine Freisetzung an p-Nitroanilin. Zur Berechnung siehe (26,27). Ordinate: ΔE (Extinktionsänderung pro 30 min); Abszisse: ImU für Trypsin.

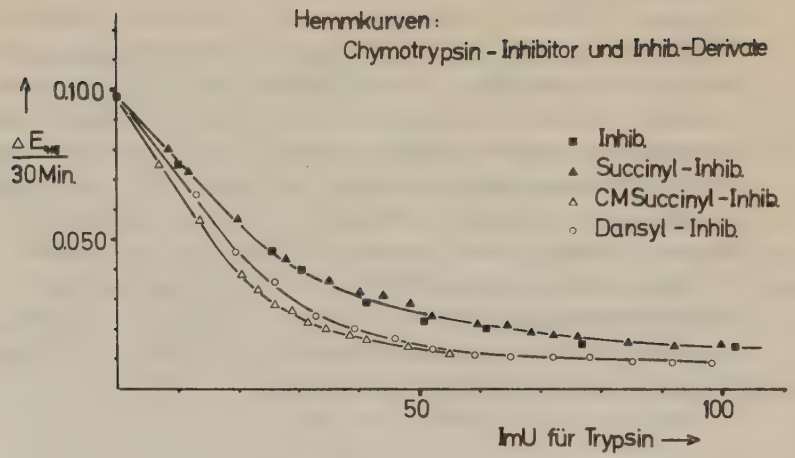


Abb. 10 Chymotrypsin-Hemmkurven

Hemmverhalten: Nach der Abbildung 10 verhalten sich der native Inhibitor und Succinyl-Inhibitor gleich, während der C.M.Succinyl- und Dansyl-Inhibitor sogar eine stärkere Affinität zum Chymotrypsin aufweisen. Der lineare Anfangsteil der Hemmkurven der letztgenannten Inhibitoren verläuft somit steiler. Bei einem Leerwert von ΔE C,098/30 min 3 ml tritt eine 50%ige Hemmung des Chymotrypsins durch den nativen und Succinyl-Inhibitor bei etwa 23 ImU für Trypsin ein, durch den Dansyl-Inhibitor bei 19 ImU, durch den C.M.Succinyl-Inhibitor bei 15 ImU.

3.2.3 Bestimmung der Plasminhemmung durch den nativen Inhibitor und durch Inhibitor-Derivate

Bedingungen: 0,1 ml Plasminlösung (1 NOVOEinheit entspricht 50 mU Plasmin in 0,0025 N HCl) wurden mit der Inhibitor-lösung (0-100 ImU für Trypsin) plus 0,2 M Triäthanolamin-puffer (plus 0,05 M Lysinhydrochlorid), pH 7,8, ad 2,0 ml für 5 min bei 25°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1,0 ml Substratlösung (1mg N^{α}-Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid in dest. Wasser) gestartet. Die Extinktionsänderung bei 405 nm wurde nach 15 s und nach weiteren 20 min gemessen. Der Plasmin-Test ähnelt dem Trypsin-Test. Es wird dasselbe Substrat verwendet, und die Extinktionszunahme wird durch die Freisetzung von p-Nitroanilin hervorgerufen. Zur Berechnung siehe (25,26).
Ordinate: ΔE (Extinktionsänderung pro 20 min); Abszisse: ImU für Trypsin.

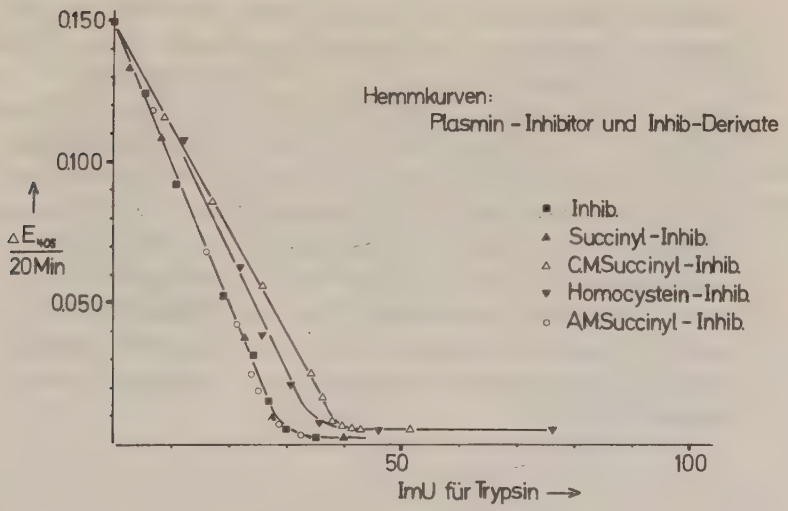


Abb. 11 Plasmin-Hemmkurven

Hemmverhalten: Die Hemmkurven des nativen Inhibitors, A.M. Succinyl- und Succinyl-Inhibitors sind identisch. Im Vergleich zu diesen besitzt der Homocystein-Inhibitor eine geringere Affinität zum Plasmin, die zum C.M. Succinyl-Inhibitor noch abnimmt. Bei einem Leerwert ΔE_{405} = 0,150/20 min 3 ml tritt eine 50% Hemmung des Plasmins durch den nativen-, Succinyl-, A.M.Succinyl-Inhibitor bei 15 ImU für Trypsin ein, durch den Homocystein-Inhibitor bei 19ImU und durch den C.M.Succinyl-Inhibitor bei 21 ImU.

3.2.4 Bestimmung der Kallikreinhemmung durch den nativen Inhibitor und durch Inhibitor-Derivate

Bedingungen: 0,1 ml Kallikreinlösung aus Schweinepankreas (ca. 0,6 biologische Kallikreineinheiten = KE (28), d.s. ca. 60 mU bei der Spaltung von N^{α}-Benzoyl-L-arginin-äthylester (29) wurden mit der Inhibitorlösung (0-25 ImU für Trypsin) plus 67 mM Triäthanolaminpuffer (plus 0,1 M NaCl und 10 µM Äthylendiamintetraessigsäure), pH 8,0, ad 2,5 ml für 10 min bei 25° C inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Substratlösung (0,52 mg N^{α}-Benzoyl-L-argininäthyleser in demselben Puffer) gestartet. Meßstrahlung 253 nm, Schichtdicke 1 cm, Temperatur 25° C. Die Extinktionsänderung wurde mit Hilfe eines Verstärker-Schreibers ("Servogor", angeschlossen am thermostatisierten "Leitz Unicam SP 820"-Spektralphotometer) registriert. Sie wird durch die Freisetzung von Benzoylarginin aus dem Äthylester (BAEE) hervorgerufen. Als Maß für die Extinktionsänderung dient der Tangens des Winkels α zwischen der Null-Linie und dem linearen Anfangsteil der Extinktionskurve. Ordinate: $tg\alpha$; Abszisse: ImU für Trypsin.

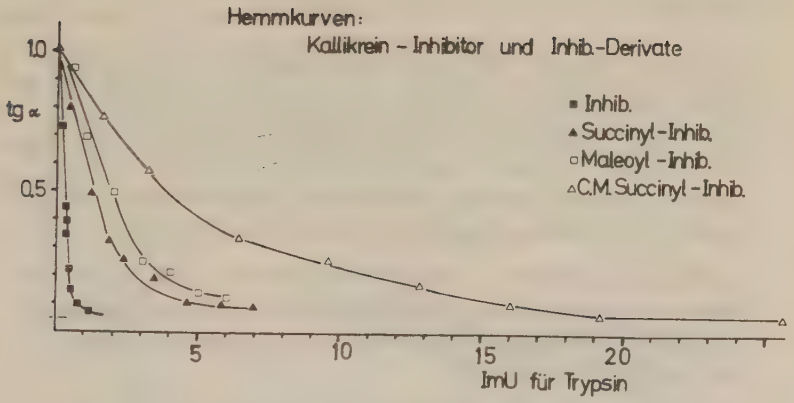


Abb. 12 Kallikrein-Hemmkurven

Hemmverhalten: Auf Abb. 12 ist das starke Hemmvermögen des nativen Inhibitors auffallend. Die Affinität des Succinyl- und Maleoyl-Inhibitors zum Kallikrein ist deutlich geringer als die des nativen Inhibitors. Die Hemmkurve des C.M-Succinyl-Inhibitors verläuft am flachsten, was auf eine relativ schwache Hemmwirkung schließen läßt. Bemerkenswert ist die Abnahme der Affinität der Derivate zum Kallikrein, die hier mit einer Zunahme der negativen Ladung korreliert ist.

3.3 Zusammenfassende Darstellung der Hemmkurven

Von allen Inhibitor-Derivaten weicht nur der C.M.Succinyl-Inhibitor auffällig ab und zwar durch seine äußerst geringe Hemmwirkung gegenüber Kallikrein; gegenüber Plasmin ist sie nur schwach vermindert. Gegenüber Trypsin zeigt er eine dem nativen Inhibitor gleiche Hemmwirkung, während er auf das Chymotrypsin stärker hemmend als der native Inhibitor wirkt.

Der Succinyl-Inhibitor verhält sich identisch mit dem nativen Inhibitor gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin, jedoch ist gegenüber Kallikrein eine deutliche Abnahme der Hemmfähigkeit festzustellen.

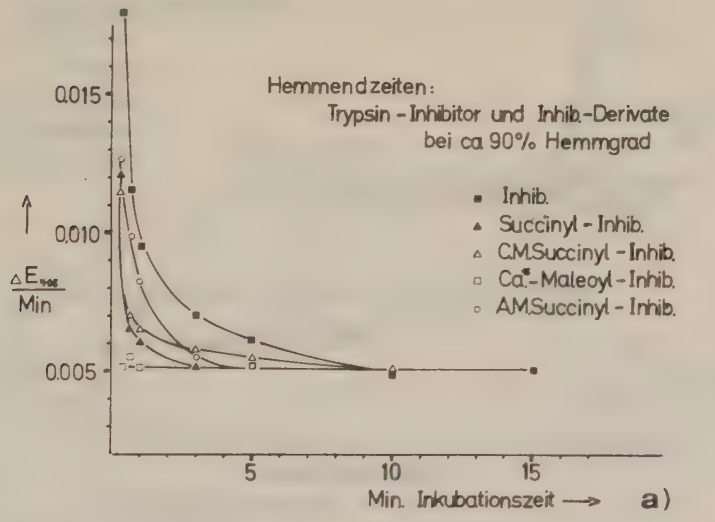
Bei den übrigen Inhibitor-Derivaten sind in Bezug auf die vier Enzyme im Vergleich zum nativen Inhibitor keine wesentlichen Änderungen auffällig.

3.4 Bestimmung der benötigten Zeitspanne bis zur Einstellung des Hemmgleichgewichtes ("Hemm-Endzeit")

"Hemm-Endzeit"-Kurven wurden bei einem konstanten Gehalt an ImU, d.h. bei konstantem Hemmgrad gemessen. Sie geben durch ihren Verlauf eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-Inhibitor-Komplex-Bildung. Ist das Enzym „vollständig" abgesättigt, so ist eine Einstellung des Hemmgleichgewichtes erfolgt. Trotz verlängerter Inkubationszeit wird eine gleichbleibende Extinktionsdifferenz gemessen. Die Meß-Kurve geht in eine Horizontale über und gibt damit die Hemm-Endzeit an. Tritt das Hemmgleichgewicht nach kurzer Inkubationszeit ein, so spricht das für eine große Affinität des Inhibitors zum Enzym und für ein schnelles Hemmvermögen. Bei niedrigen Hemmgraden (z.B. 30 oder 50%)wird das Hemmgleichgewicht schneller erreicht als bei hohen Hemmgraden. Dies erklärt sich aus dem relativen Überschuß an freiem Enzym in der Lösung. Da Unterschiede in den Hemm-Endzeiten eher bei höheren als bei niedrigeren Hemmgraden auftreten, werden in den folgenden Versuchen die Hemm-Endzeiten bei 70 und 90% Hemmgrad gemessen. Vor Beginn der eigentlichen Meßreihe testet man diejenige Inhibitormenge aus, die eine gegebene Enzymaktivität zu 70 bzw. 90% inhibiert.

3.4.1 Bestimmung der Trypsin-Hemm-Endzeiten bei 90 proz. Hemmgrad

Bedingungen: Die Inhibitor-Trypsinansätze mit konstantem Gehalt an ImU (Hemmgrad 90%) wurden vor der Substratzugabe unterschiedlich lange inkubiert (20 sec - 15 min). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen (405 nm) im Verhältnis zur variablen Inkubationszeit. Die übrigen Bedingungen sind analog dem Testverfahren für die Trypsin-Hemmkurven.



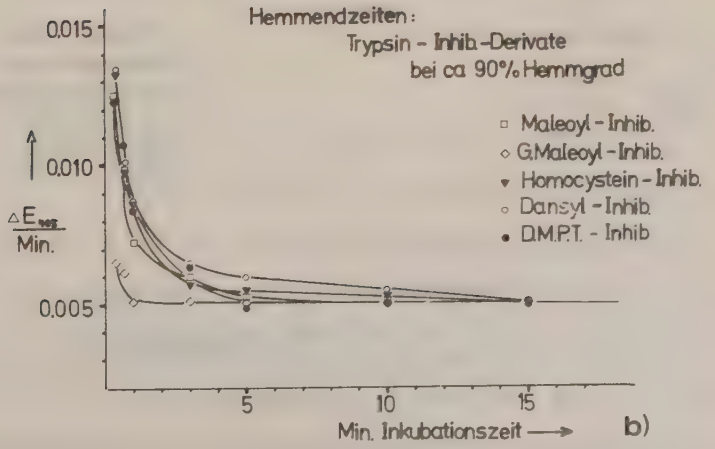
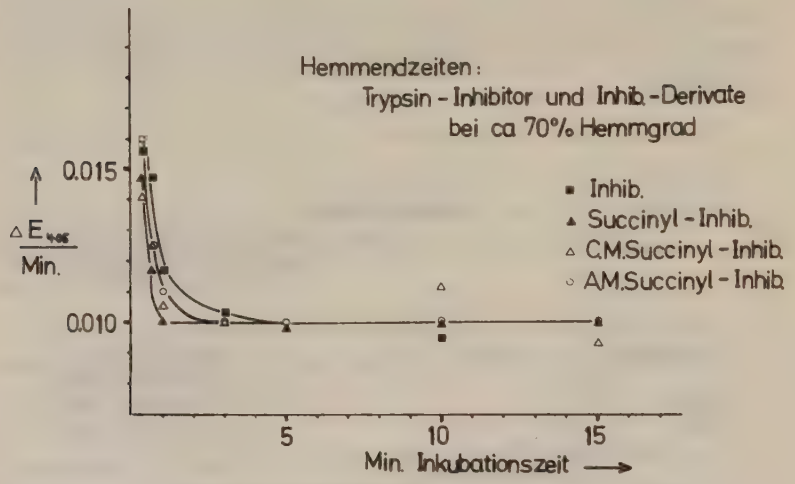


Abb. 13 a und b Hemm-Enzeiten (Trypsin bei 90 proz. Hemmgrad)

3.4.2 Bestimmung der Trypsin-Hemm-Endzeiten bei 70 proz. Hemmgrad

Sonstige Bedingungen siehe Text oben.



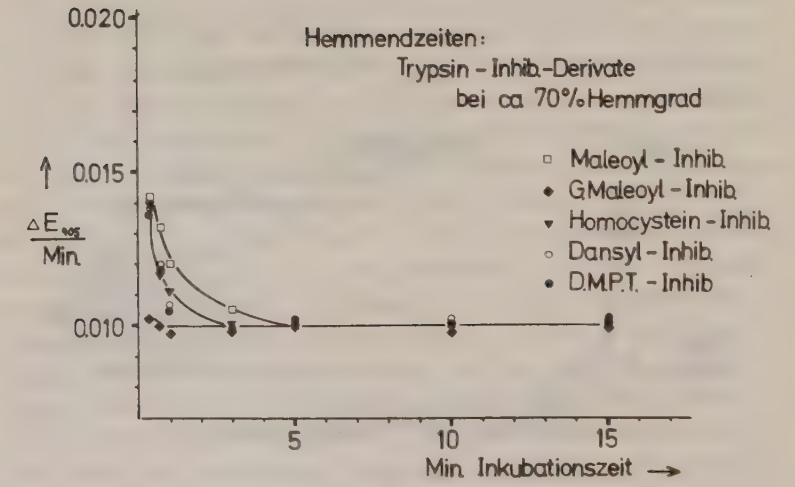


Abb. 14 a und b Hemm-Endzeiten (Trypsin bei 70 proz. Hemmgrad)

3.4.3 Bestimmung der Chymotrypsin-Hemm-Endzeiten bei 90 und 70 proz. Hemmgrad

Bedingungen: Die Inhibitor-Chrymotrypsinansätze mit konstantem Gehalt an ImU für Trypsin (Hemmgrad 90 bzw. 70%) wurden vor der Substratzugabe unterschiedlich lange inkubiert (20 sec - 15 min). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen(405 nm) im Verhältnis zur variablen Inkubationszeit. Die übrigen Bedingungen sind analog dem Testverfahren für die entsprechenden Chymotrypsin-Hemmkurven.

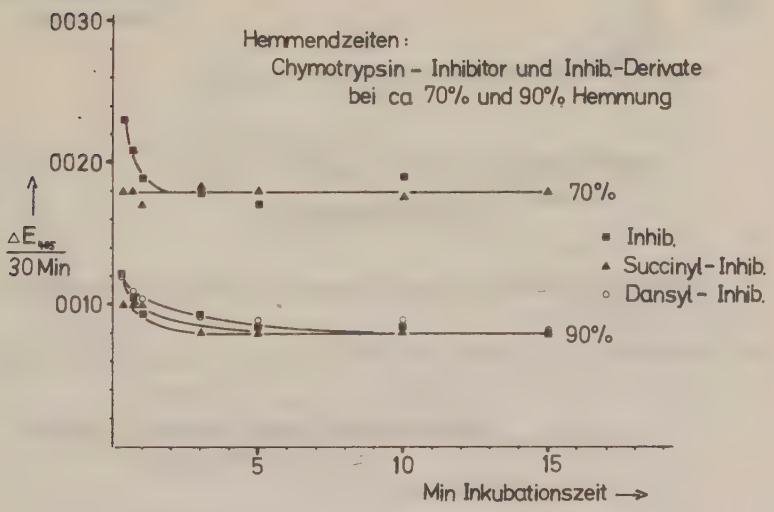


Abb. 15 Hemm-Endzeiten (Chymotrypsin bei 70 und 90 proz. Hemmgrad)

3.4.4 Bestimmung der Plasmin-Hemm-Endzeiten bei 90 proz. Hemmgrad

Bedingungen: Die Inhibitor-Plasminansätze mit konstantem Gehalt an ImU für Trypsin (Hemmgrad 90%) wurden vor der Substratzugabe unterschiedlich lange inkubiert (20 sec - 15 min). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen (405 nm) im Verhältnis

zur variablen Inkubationszeit. Die übrigen Bedingungen sind analog dem Testverfahren für die entsprechenden Plasmin-Hemmkurven.

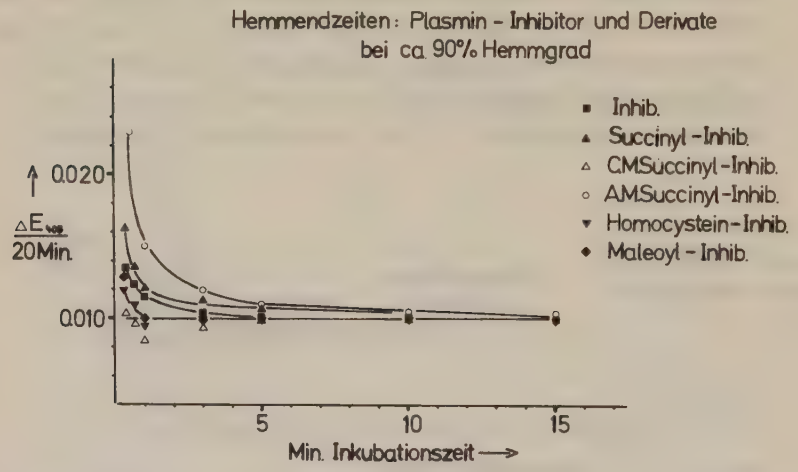


Abb. 16 a Hemm-Endzeiten (Plasmin bei 90 proz. Hemmgrad)

3.4.5 Bestimmung der Plasmin-Hemm-Endzeiten bei 70 proz. Hemmgrad

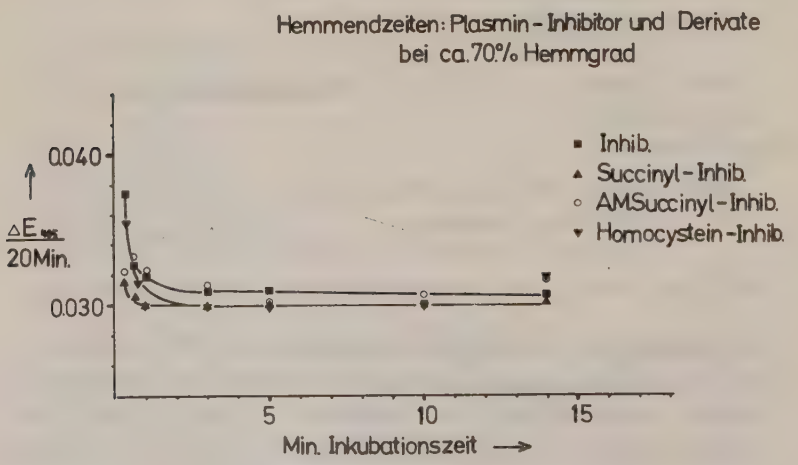


Abb. 16 b Hemm-Endzeiten (Plasmin bei 70 proz. Hemmgrad)

3.4.6 Bestimmung der Kallikrein-Hemm-Endzeiten bei 90 proz. Hemmgrad

Bedingungen: Die Inhibitor-Kallikreinansätze mit konstantem Gehalt an ImU für Trypsin (Hemmgrad 90%) wurden vor der Substratzugabe unterschiedlich lange inkubiert (20 sec - 15 min). Gemessen wurden die Extinktionsänderungen (253 nm) im Verhältnis zur variablen Inkubationszeit. Die übrigen Bedingungen sind analog dem Testverfahren für die entsprechenden Kallikrein-Hemmkurven.

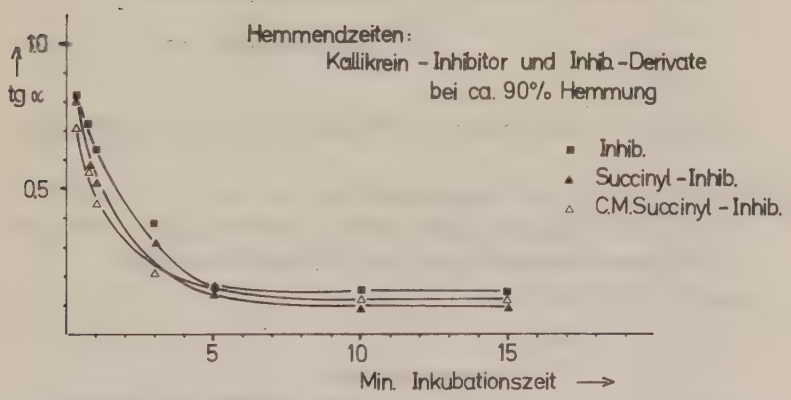


Abb. 17 a Hemm-Endzeiten (Kallikrein bei 90 proz. Hemmgrad)

3.4.7 Bestimmung der Kallikrein-Hemm-Endzeiten bei 70 proz. Hemmgrad

Bedingungen wie bei 3.4.6.

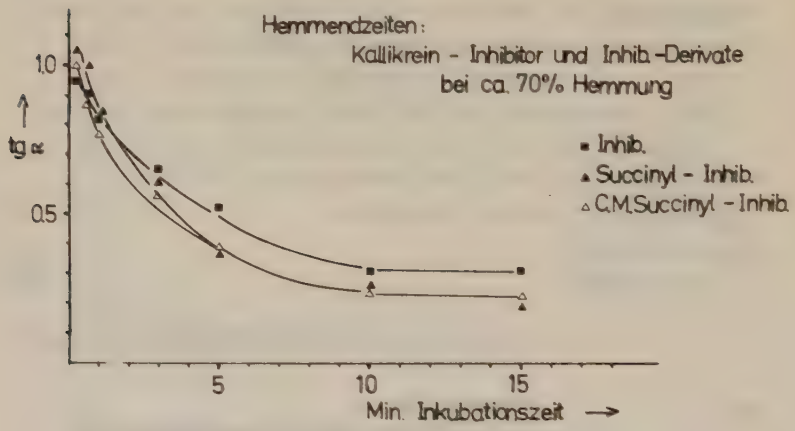


Abb. 17 b Hemm-Endzeiten (Kallikrein bei 70 proz. Hemmgrad)

3.4.8 Abb. 17 c gibt eine Gegenüberstellung der Abb. 17 a und 17 b zum Vergleich der Hemm-Endzeiten bei 70 und 90 proz. Hemmgrad. Die von Hemm-Endzeit-Kurven ausgefüllten Flächen sind schraffiert dargestellt.

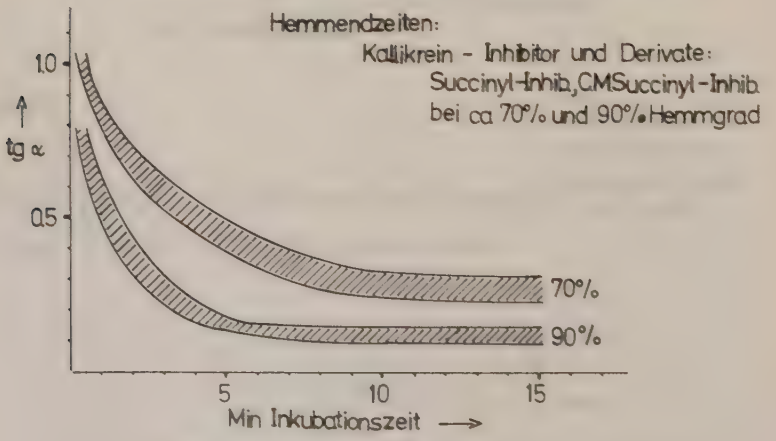


Abb. 17 c Vergleich der Hemm-Endzeiten
(Kallikrein bei 70 und 90 proz. Hemmgrad)

	Ladung +	Ladung −	Trypsin		Plasmin		Chymotrypsin		Kallikrein	
Hemmgrad in %			70	90	70	90	70	90	70	90
Nativer Inhibitor	11	4	5	10	3	5	2	10	10	5
Homocystein-Inh.	11	4	3	15	3	1	-	-	-	-
Dansyl-Inh.	11	4	3	15	-	-	-	10	-	-
D.M.P.T.-Inh.	11	4	5	3	-	-	-	-	-	-
Maleoyl-Inh.	7	8	5	10	-	1	-	-	-	-
Succinyl-Inh.	7	8	1	3	1	10	1	3	10	5
A.M.Succinyl-Inh.	7	8	3	5	3	15	-	-	-	-
C.Maleoyl-Inh.	7	4	1	1	-	-	-	-	-	-
Ca^{15}-Maleoyl-Inh.	7	4	-	1	-	-	-	-	-	-
C.M.Succinyl-Inh.	7	12	3	10	-	1	-	-	10	5

Tabelle 2 Zusammenstellung der Ladung und der Hemm-Endzeiten der Inhibitoren bei verschiedenen Enzymen. Die Hemm-Endzeiten sind in Minuten angegeben.

3.5 Zusammenfassende Betrachtung der Hemm-Endzeiten

Aus den Meßergebnissen ist zu ersehen, daß bei der Hemmung von Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin im allgemeinen eine kleinere Hemm-Endzeit bei 70 gegenüber 90 proz. Hemmgrad vorliegt. Erstaunlicherweise trifft dies für das Kallikrein nicht zu. Während die Hemm-Endzeit bei 70 proz. Hemmgrad 10 min beträgt, hat sich ein Hemmgleichgewicht in allen 3 Meßreihen bei 90 proz. Hemmgrad bereits in der Hälfte der Zeit eingestellt. Verdeutlicht wird diese Besonderheit in Abb. 17 c.

Die Meßergebnisse kann man am anschaulichsten durch eine Tabelle zusammenfassen. Um eine Interpretation zu erleichtern, werden sie mit den Ladungen der einzelnen Inhibitorderivate verglichen.
Auf die Ergebnisse wird ausführlich in der Diskussion eingegangen.

4. Diskussion

4.1 Die hier durchgeführten Versuche zur weiteren Klärung der Enzym-Inhibitor-Komplexbildung bringen zum Teil recht unterschiedliche Ergebnisse. Die voneinander abweichenden Wirkungen der einzelnen Inhibitorderivate dürften vor allem auf zwei Effekte zurückzuführen sein, auf einen Ladungs- und einen sterischen Effekt.

- Ladungseffekt: Führt man saure Gruppen in das native Inhibitormolekül ein, so verringert man die Basizität des Inhibitors. Die elektrostatische Anziehung eines basischen Enzyms, z.B. Trypsin, zum ursprünglich ebenfalls basischen Inhibitor wird somit erhöht und der "Hemm-Endgrad" wird früher erreicht.
- Sterische Effekte:
  - Durch Substitution der NH_2-Gruppen des nativen Inhibitors kommen Reste hinzu, die durch ihre Größe eventuell die Komplexbildung erschweren können.
  - Wird das Inhibitormolekül durch Substitution verändert, so hat dies möglicherweise eine Konformationsänderung der Molekülstruktur zur Folge, die nicht ohne Einfluß auf die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung bleibt.

Es ist anzunehmen, daß sich diese Wirkungen überlagern und die Meßergebnisse somit eine Resultierende der genannten Effekte sind.

4.1.1 Hemmwirkung des nativen und Succinyl-Inhibitors auf Trypsin

Der native Inhibitor ist stark basisch und die Einführung von Succinyl-Gruppen in das Molekül bewirkt eine Verringerung seiner Basizität. Da Trypsin einen isoelektrischen Punkt von etwa 10 hat, ist somit eine gesteigerte Affinität des Trypsins zum relativ sauren Succinyl-Inhibitor zu erwarten. Der Hemm-Endgrad tritt, wie die Meßergebnisse zeigen, bereits nach 1 bis 3 Minuten ein. Beim nativen Inhibitor wird mit seinem dem Trypsin nahezu gleichen IP

von 10,5 zur Gleichgewichtseinstellung die wesentlich längere Zeitspanne von etwa 10 min benötigt. Hier überwiegt also ein eindeutiger Ladungseffekt.
Das "Negativ-Werden" des Inhibitors beschleunigt in diesem Falle die Geschwindigkeit der Enzym-Inhibitor-Komplexbildung. Erfolgte durch Substitution des Inhibitor-Moleküls keine Verschiebung der Ladung, wie z.B. beim Dansyl- und Homocystein-Inhibitor, so konnte eher eine Verlängerung der Hemmendzeit, d.h. eine Verlangsamung der Komplexbildung festgestellt werden.
Aus dem identischen Verlauf aller untersuchten Trypsin-Hemm-Kurven - siehe Bild 9 - mit Ausnahme von D.M.P.T., ist auf eine nahezu gleiche Assoziationskonstante der Inhibitoren zu schließen.

4.1.2 Hemmwirkung des nativen, Succinyl-, A.M.Succinyl- und C.M. Succinyl-Inhibitors auf Plasmin.

Die Modifizierung des nativen Inhibitors mit Abschwächung der Basizität nähert seinen IP von 10,5 dem IP des Plasmins, der etwa bei 6,2 liegt. Die elektrostatischen Kräfte des Inhibitors zum Plasmin werden verringert; es ist eine Verlangsamung der Komplexbildung zu erwarten. Für diese reduzierte Affinität beider Partner sprechen die gefundenen Hemm-Endzeiten von 10 Minuten des Succinyl- und 15 Minuten des A.M.Succinyl-Inhibitors, während der native Inhibitor zur Einstellung seines Hemmgleichgewichtes nur 5 Minuten benötigt.

4.1.3 Chymotrypsin-Hemmung

Bei ihrer Betrachtung reichen die Ergebnisse zu einer eindeutigen Interpretation nicht aus, da aus methodischen Gründen eine exakte Bestimmung nicht möglich ist.

4.1.4 Hemmwirkung des nativen, Succinyl- und C.M.Succinyl-Inhibitors auf Kallikrein

Die Ergebnisse zeigten, daß die Abnahme der Affinität der Inhibitorderivate zum Kallikrein mit einer Zunahme

ihrer negativen Ladung korreliert ist. Jede hier durchgeführte Modifizierung des nativen Inhibitors erhöht also die Dissoziationskonstanten der einzelnen Derivate um ein beträchtliches Maß (Abb. 12).
Auf die Komplexbildungsgeschwindigkeit jedoch hat die veränderte Ladung des Inhibitors kaum einen Einfluß, wie aus den Bildern 17 a und b zu ersehen ist. Da wir im Kallikrein ein hochspezifisches Enzym vor uns haben, ist anzunehmen, daß die durch Substitution veränderte Konformation des Inhibitor-Moleküls für die erhöhte Dissoziation des Komplexes verantwortlich ist. Es liegt hier also hauptsächlich ein sterischer Effekt vor.

4.2 Erläuterungen zu den einzelnen Testmethoden

Zur Bestimmung der benötigten Zeitspanne bis zur Einstellung des Hemmgleichgewichtes von Chymotrypsin mit dem Inhibitor (siehe 3.4.6) müssen einige kritische Bemerkungen gemacht werden.

Die Komplexbildung von Enzym und Inhibitor erfolgt in wenigen Minuten. Eine Änderung der Komplexbildungsgeschwindigkeit wird sich also nur dann in einer Extinktionsänderung sicher fassen lassen, wenn diese sich in kurzen Zeitabschnitten exakt bestimmen läßt. Beträgt die Meßdauer für einen Meßwert 30 Minuten, die hier bei dieser Testmethode wegen der geringen Aktivität von Chymotrypsin notwendig ist, so wird sich die in den ersten Minuten auftretende geringe Extinktionsänderung nicht im Gesamtmeßwert äußern. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß sich nicht nur während der variablen Inkubationszeit, sondern auch während der Extinktionsmessung Enzym-Inhibitor-Komplexe bilden und dies um so mehr, je länger die Messung dauert. Je länger also die Messung für einen einzigen Wert dauert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß man trotz der verschiedenen Inkubationszeiten identische Ergebnisse erhält.

Ähnlich wie Chymotrypsin bestimmt man Plasmin (siehe 3.4.4). Die Meßdauer für einen Meßwert beträgt hier 20 Minuten. Die für die Bestimmung der Chymotrypsin-Hemmendzeit gemachten Einschränkungen gelten somit auch für die Plasmin-

Hemm-Endzeiten, da man aus methodischen Gründen ähnliche Kurven erhält.
Die Methode der Trypsinhemmung ist für die Bestimmung von Hemmendzeiten gut geeignet, denn die hohe Aktivität erlaubt die kurze Meßdauer von nur einer Minute. Nähere Einzelheiten siehe 3.4.3. Die Extinktionsänderung wird 5 Minuten alle 60 Sekunden abgelesen. So entsteht ein recht genaues Bild über die Geschwindigkeit, mit der sich das Hemmgleichgewicht einstellt.

Bei der Bestimmung der Hemm-Endzeiten von Kallikrein am LKB Unicam SP 820 Spektralphotometer (siehe 3.4.6) erhält man ebenfalls eine gute Darstellung der Hemmgleichgewichtseinstellung, da die Freisetzung von Benzoylarginin aus dem Äthylester mit einem Verstärker-Schreiber kontinuierlich registriert werden kann. Man erhält so eine Verlaufskontrolle über die Komplexbildung.

Die oben genannten Einschränkungen zur Bestimmung der Hemm-Endzeiten gelten nicht für die Aufnahme der Hemmkurven, denn bei den Hemmkurven interessiert nicht die Einstellung des Gleichgewichtes, sondern das Hemmverhalten des Inhibitors zum Enzym. Hier werden die einzelnen Reaktionen erst nach für die Inhibitoren individuellen Inkubationszeiten gestartet, also nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor eingestellt hat.

Als Nebenbefund ist noch zu erwähnen, daß die bisher allgemein übliche Inkubationszeit im Trypsintest von 5 Minuten bei höheren Hemmgraden nicht ausreichend ist. Bei der Bestimmung der Hemm-Endzeiten des nativen und von modifizierten Inhibitoren trat die Gleichgewichtseinstellung erst nach 10 bis 15 Minuten ein. Bei allen Trypsin-Testen mit Hemmgraden über 50% sollte diese verlangsamte Gleichgewichtseinstellung berücksichtigt werden.

5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit ist der Versuch gemacht worden, mit biochemisch modifizierten Derivaten des polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors weitere Aussagen über das Hemmverhalten des Inhibitors und seiner Derivate gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein zu gewinnen. Dazu wurden nicht nur Hemmkurven aufgenommen (variable ImU bei konstanten Inkubationszeiten), sondern auch sogenannte "Hemm-Endzeiten". Darunter versteht man die Messung der benötigten Zeitspanne bis zur Einstellung des Hemmgleichgewichtes bei einem bestimmten Hemmgrad (70 und 90 proz. Hemmgrad unter variablen Inkubationszeiten). Mit diesen Methoden wurden die Eigenschaften der modifizierten Inhibitoren charakterisiert und mit denen des nativen Inhibitors verglichen und interpretiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich mehrere Effekte wie Ladung, Konformation und Molekülgröße überlagern und die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung beeinflussen. So ergab eine Substitution der NH_2-Gruppen des nativen Inhibitors mit sauren Valenzen, wie z.B. beim Succinyl-Inhibitor, mit Trypsin eine beschleunigte Komplexbildung. Auf die Hemmwirkung gegenüber Trypsin hatte diese Modifizierung keinen Einfluß.

Succinyl- und A.M.Succinyl-Inhibitor - im Vergleich zum nativen Inhibitor "saure" Derivate - zeigten mit Plasmin eine verlangsamte Komplexbildung, was wiederum als Ladungseffekt interpretiert werden kann. Die allerdings zum Plasmin eingetretene reduzierte Affinität der Inhibitoren wird verständlich, wenn man die mit der Modifizierung eingetretene Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Inhibitoren im Verhältnis zu dem des Enzyms berücksichtigt.

Die Derivate Succinyl- und C.M.Succinyl-Inhibitor zeigten dagegen im Test mit Kallikrein keine Veränderung der Komplexbildungsgeschwindigkeit, aber eine verminderte Hemmwirkung.

Die Abnahme der Affinität der Derivate zum Kallikrein ist mit einer Zunahme der negativen Ladung korreliert. Diese erhöhte Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist hier einem sterischen Effekt zuzuschreiben.
Die Hemm-Endzeiten der Inhibitorderivate mit Chymotrypsin und z.T. auch mit Plasmin sind aus methodischen Gründen nicht voll auszuwerten.

6. Literaturverzeichnis

1 KRAUT, H., E.K. FREY, E. WERLE
Z. physiol. Chemie 192 (1930)

2 M. KUNITZ, I.H. NORTHROP,
J. gen. Physiol. 19, 991 (1936)

3 N.M. GREEN, E. WORK,
Biochem. J. 54 (1953),257

4 LASKOWSKI, M., S.P. COLOWICK, N.O. KAPLAN
Methods in Enzymology, II (1955), 36

5 KASSELL, B., M. RADICEVIC, et al.,
J. biol. Chem. 238 (1963), 3274

6 WERLE, E., W. APPEL,
Naturwissenschaften 45 (1958), 60

7 ASTRUP, T., 18. Int. Physol.Congr. Copenhag. 1950,S.81

8 WERLE, E., W. APPEL,
Z. Naturforsch. 146 (1969), 385

9 GÜLZOW, M., H.I.TRETTIN, K.PIESCHE, K.SCHULZ,
Acta biol. med. germ. 12 (1964), 529

10 KASSELL u. M.LASKOWSKI Sr.,
Biochem. Biophysic. Res. Commun. 20, 463 (1965)

11 ANDERER, F.A. u. S. HÖRNLE, J. biol. Chemestry 241,1568 (1966)

12 ANDERER, F.A. u. S. HÖRNLE, Ann.New York Acad.SCi. 146,381 (1968)

13 KASSELL,B., M.RADICEVIC, M.J. ANSFIELD u. M.LASKOWSKI Sr.
Biochem. biophysic. Res. Commun. 18, 255 (1965)

14 CHAUVET, J. et R. ACHER, J. Biol.Chem. 242, 4274 (1967)

15 KRESS, L.F., M. LASKOWSKI, Sr., J. Biol. Chem. 242,4925 (1967

16 WERLE, E., Zur Biochem. d. Trasylol
Neue Aspekte der Trasyloltheorie III, Schattauer Verlag

17 TRAUTSCHOLD, E.K., E. WERLE, H. FRITZ
Zur Biochem. d. T., Neue Aspekte d. Trasylolth. I

18 KALLER, H., Pharmak. d. Trasylols in Neue A.d.T. II

19 HABERMANN, E., Probleme d. Pathophysiol d. Kininsystems Neue Asp. d. Trasylolth. III

20 WEBSTER, M.E., O.D.RATENOFF, Nature (London)192,180 (1961)

21 HABERMANN, E., Mechan. d. Kininbildung, Neue Asp. d. Trasyloltherapie I

22 HOFFBAUER, H., Hyperfibrinol. Krisen b. gyn. u. geburtshilfl. Operationen, Neue Aspekte d. T. II

23 HABERLAND, G.L., Einleit. Bemerk. zu d. Grundlagen d. Trasylolth. II

24 KREMER, H., Dissertation in Vorbereitung

25 FRITZ, H., G. HARTWICH u. E. WERLE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 150

26 FRITZ H., I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE in H.U. Bergmeyer, Methoden d. Enzymat. Analyse, Verlag Chemie

27 FRITZ, H., F. WOITINAS u. E. WERLE, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 345, 168 (1966)

28 FIEDLER, H. u. E. WERLE, Europ. J. Biochem. (Berlin) 7, 27 (1968)

29 FRITZ, H., I. Eckert u. E. WERLE, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1120 (1967)

30 Schult, H., Dissertationsarbeit in Vorbereitung

31 RAPOPORT, S.M. Medizinische Biochemie, 4. Auflage

32 WERLE, E., Kinine, Pharmazeutische Zeitung 42, 1968

L E B E N S L A U F

Am 15. Februar 1944 wurde ich, Gundula Sabine Zetzmann, als drittes Kind des Reg. Baudirektors Dr.=Ing. Hans Joachim Zetzmann und seiner Ehefrau Luise, geb. Quast, in Berlin-Zehlendorf geboren. Kurz vor Kriegsende siedelten meine Eltern nach München über. Hier besuchte ich die Volksschule und später als Oberschule des Deutsche Gymnasium. Dort legte ich im Juni 1965 die Reifeprüfung ab. Anschließend absolvierte ich einen halbjährigen Abiturientinnen-Kursus in Haushaltsführung bei der Mathilde-Zimmer-Stiftung in Coburg.

Im Sommer 1966 begann ich in München mein Medizinstudium. 1967 legte ich mein Vorphysikum und 1968 mein Physikum ab.

Seit 1970 bin ich mit cand.med. Heinrich Kremer verheiratet. 1972 legte ich die Prüfung zum Staatsexamen ab.

München, August 1972